

La microbiología oral en la era de la genómica y la proteómica

Evelio J. Perea

Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla. España.

Introducción

Gracias a las técnicas de biología molecular en los últimos años nuestros conocimientos sobre la microbiología oral se han multiplicado exponencialmente y en la actualidad se considera que la cavidad oral del ser humano es el nicho ecológico con mayor biodiversidad conocido hasta ahora. Si en el año 2001 se estimaba que existían 500 especies en la cavidad oral, hoy se calculan que serían unas 700 las que la habitan^{1,2}.

La mayoría de estas especies bacterianas se consideran comensales; un pequeño grupo de ellas se comporta como patógenos oportunistas en la propia cavidad oral; otras causan infecciones sistémicas como endocarditis, neumonía por aspiración u osteomielitis en niños y, finalmente, algunas también podrían estar implicadas en la patogenia de la obstrucción coronaria y la trombosis cerebral a través de su contribución a la formación de placas de ateroma^{3,4}.

Hasta ahora nuestra aproximación al conocimiento de la flora microbiana oral se había realizado por medio del cultivo e identificación bioquímica o cromatográfica de las especies aisladas. Lógicamente se han cultivado las especies que podían crecer en los medios utilizados, pero no podíamos conocer todas aquellas especies que no pueden crecer en ellos y cuyas necesidades nutritivas ignoramos.

Las especies conocidas hasta ahora se ha venido identificando por su implicación en la patología sistémica, como en endocarditis infecciosa y abscesos cerebrales o en infecciones de la propia cavidad bucal como periodontitis y abscesos. Actualmente y gracias a técnicas de biología molecular se empiezan a conocer, a través de estudios sistemáticos, parte de esa flora oral hasta ahora desconocida^{1,2}.

Métodos moleculares

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de amplificación más sensible y la que se aplica más satisfactoriamente en microbiología clínica. En particular, se utiliza esta técnica en el caso de patógenos que son difíciles de cultivar o que presentan crecimiento lento, así como en el de todas aquellas infecciones clínicamente atribuibles a nuevos agentes.

Se han desarrollado protocolos para identificar de forma específica y rápida a bacterias de diagnóstico lento o difícil, como la flora oral implicada en las periodontitis, para detectar en ellas la presencia de ge-

nes de importancia clínica, como los que codifican resistencia a antibióticos o los que confieren mayor virulencia a los organismos que los portan. De esta forma se ha identificado un fago integrado en *Treponema denticola* responsable de producción de leucocidina.

Durante los últimos años ha cobrado gran interés el desarrollo de las denominadas *PCR múltiples*, reacciones que consiguen detectar de forma simultánea y en un único tubo, diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de una misma bacteria o de diferentes especies en una sola muestra clínica⁴⁻⁶.

Esta técnica se ha completado con la utilización de *PCR en tiempo real*, método que combina la PCR con el uso de marcadores fluorescentes de forma que se pueda registrar la cinética de la reacción. Esto ha permitido el desarrollo de nuevos y eficientes protocolos de PCR múltiple por su rapidez y sencillez. La técnica de Microdent® utiliza como primer paso una PCR múltiple a partir de muestras de exudado periodontal⁷.

Existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita mucho tiempo, resulta difícil e incluso a veces imposible. En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el *análisis del ARN ribosómico (ARNr) 16S* (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas⁸⁻¹⁰.

La identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S en los laboratorios clínicos se centra principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, incluyendo bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas, situación que en ocasiones ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos^{10,11}.

Actualmente la secuenciación del ARNr 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana que nos ha permitido el descubrimiento de nuevas bacterias, especialmente en la cavidad oral. Diariamente se usa la amplificación por PCR del ARNr 16S y su posterior hibridación con sondas para la detección de las principales especies periodontopatógenas⁷.

Proteómica

El término “proteoma” fue acuñado por Marc Wilkins en 1994 para describir “todas las proteínas expresadas por un genoma”. La genómica y la transcriptómica proporcionan la secuencia de un ADN, los elementos reguladores y la expresión del gen. La “proteómica” ofrece el perfil de proteínas totales de una célula o un microorganismo¹³.

El proteoma es una caracterización de las proteínas expresadas *in vitro* por un genoma en diferentes condiciones. Pero lo que más se utiliza es el estudio comparativo de dichas proteínas en diferentes condiciones fisiológicas, lo que ofrece una visión de los cambios fenotípicos que sufre un microorganismo en función de las circunstancias que le rodean. Como ejemplos de su aplicación al estudio de la patogenia de las infecciones producidas por la flora de la boca citaremos:

Correspondencia: Dr. E.J. Perea.
Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla.
Apartado 914. 41080 Sevilla. España.
Correo electrónico: epereap@us.es

Manuscrito recibido el 10-12-2004; aceptado el 15-12-2004.

Caries dental y *Streptococcus sobrinus*

Se ha detectado que la presencia de flúor en el medio no sólo determina la formación de fluorapatita por el esmalte, lo que le protege de los ácidos bacterianos, sino que *S. sobrinus*, que expresa diferentes proteínas, en presencia de flúor presenta pérdida de la capacidad de formar las lectinas que le permiten la unión de los glucanos y su adhesión al esmalte¹⁴.

Endocarditis infecciosa

S. gordonii y *S. oralis* forman parte de la flora normal de la boca y se pueden asociar a endocarditis bacteriana. Cuando estos estreptococos, que viven en la boca a un pH ácido de 6 a 6,5, pasan a la sangre encuentran un pH más elevado, de 7,3. Esto determina cambios en su formación de proteínas lo que le permite entonces adherirse y colonizar las válvulas cardíacas¹⁵.

El tratamiento de la endocarditis producida por estos estreptococos puede ser problemático por el fenómeno de tolerancia a la penicilina que pueden desarrollar los mismos. Por medio de la proteómica hoy se conocen las dos proteínas que producen los *Streptococcus* y que condicionan este fenómeno de tolerancia a la penicilina¹⁶.

Aplicación de la biología molecular al estudio de la etiología bacteriana de la periodontitis

Hasta ahora se consideraba que la mayoría de las especies bacterianas implicadas en las diversas formas de periodontitis eran saprofitos comunes de la cavidad oral, que sólo expresan su capacidad patógena en huéspedes genéticamente susceptibles y/o cuando se producen determinadas circunstancias exógenas de riesgo. Dentro de esas especies consideradas "marcadores de periodontitis" se han establecido tres categorías: las muy patógenas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus*) y las patógenas (*Prevotella intermedia* y *Treponema denticola*). Estas cinco especies son las que detecta el sistema Microdent® (tabla 1). Finalmente se citan hasta cinco especies más que potencialmente pueden estar implicadas, si se encuentran en una alta concentración.

Después de los trabajos iniciales en los que, utilizando el estudio del ARNr 16S se puso de manifiesto la extraordinaria riqueza y biovariedad que existe en el surco gingival y en los que se identificaron 132 especies conocidas y 215 nuevos filotipos desconocidos hasta entonces, se ha

tratado de identificar los potenciales patógenos periodontales dentro de esa amplia gama de especies nuevas encontradas^{1,2}. En los casos de periodontitis crónica se han identificado una serie de nuevas bacterias o filotipos aún no cultivados, como los clones DO84 y BH017 pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*, el clon BB166, perteneciente a *Magasphaera*, además de otros clones no pertenecientes a ningún phylum conocidos y finalmente algunas especies ya conocidas como *Eubacterium sapenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *P. denticola* y *Cryptobacterium curtum*. En las personas sanas se encontró que entre las especies o filotipos más prevalentes se encontraban dos no identificados ni cultivados aún, como el clon WO90 del phylum *Defribacter* y el BV063 de *Bacteroidetes* y que se han denominado *Atopobium rimate* o *A. parvulum*².

¿Infecciones orales monomicobianas?

Aún consideramos que todas las infecciones de la boca son polimicrobianas y siguen el modelo de infección mixta producida por la propia flora residente. Para este modelo no nos es útil el modelo tradicional de infección monomicobiana. Es necesario que profundicemos en su patogenia e identifiquemos los verdaderos responsables de cada proceso infeccioso oral y si es la flora residente, investiguemos si son unos determinados clones los causantes o si esa flora saprofita ejerce una acción patógena al adquirir caracteres de patogenicidad por la conversión de un fago o la incorporación de plásmidos de virulencia.

Actualmente también se empieza a conocer la dinámica de transmisión interpersonal de especies y clones en el ámbito familiar y a identificar epidemiológicamente las cepas y clones responsables de algunos procesos patológicos¹².

Tratamiento de las infecciones orales

En este número de la revista se revisa el fundamento farmacodinámico del tratamiento de los mismos y se explica el éxito terapéutico con los antimicrobianos de amplio espectro recomendados actualmente en estas infecciones mixtas¹⁷. Sin embargo, pensamos que en un futuro debiéramos realizar una terapéutica de corto espectro más específica, dirigida al patógeno verdaderamente responsable, si lo hubiere, de cada proceso.

Las más importantes enfermedades de la boca como la caries dental, enfermedad periodontal y periimplantitis se producen como consecuencia de la placa dental¹⁸. Esta placa es un biofilm formado por microorganismos que se unen firmemente a un sustrato sólido y al mismo tiempo entre ellos mismos por medio de los polímeros que forman. Una vez integradas las bacterias en el biofilm se muestran más resistentes a los antimicrobianos y manifiestan un diferente comportamiento comparativamente considerado con el estado libre. Si conociéramos los factores que determinan esta forma de agregación y el desarrollo del biofilm podríamos desarrollar una estrategia de tratamiento y/o prevención de su formación y en consecuencia de las enfermedades odontológicas más frecuentes.

TABLA 1. Diversidad de especies bacterianas y nuevos filotipos en la flora de la boca en pacientes con periodontitis y personas sanas

Población	Número spp.	Nuevos filotipos	Total
Sanos	42	30	72
Periodontitis	46	45	91
Periodontitis refractaria	112	101	213
Periodontitis en VIH	6	5	11
Total	132	215	347

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Conclusión

La aplicación de los métodos moleculares al estudio de la flora de la boca y sus características están revolucionando nuestros conocimientos sobre la misma. Sería necesario revisar los criterios que hasta ahora teníamos sobre ella, sus características de patogenicidad, ecología e implicación en las diversas infecciones orales y de esta manera poder establecer unos tratamientos específicos para las diversas especies y los diferentes procesos en que están implicadas.

Bibliografía

1. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Jour Bact* 2001;183:3770-83.
2. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ, et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003;82:338-44.
3. Ishihara N, Nabuchi A, Ito R, Migachi K, Okuda K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in carotid coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol* 2004;42:1313-5.
4. Méndez-Álvarez S, Pérez Roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2004;22:182-92.
5. Pérez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Méndez Álvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39:4037-41.
6. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4089-94.
7. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2002;29:638-44.
8. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2004;22:238-45.
9. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990;323:1573-80.
10. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001;6:313-21.
11. Woo PC, Ng KH, Lau SK, Yip KT, Fung AM, Leung KW, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* 2003;41:1996-2001.
12. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal diseases and risk for nosocomial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. Systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:54-69.
13. Macarthur DJ, Jacques NA. Proteome analysis of oral pathogens. *J Dent Research* 2003;82:870-8.
14. Cox SD, Lassiter MO, Miller BS, Doyle RJ. A new mechanism of action of fluoride on streptococci. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428:415-23.
15. Vriesema AJ, Dankert J, Zaaij SA. A shift from oral to blood pH is a stimulus for adaptive gene expression of *S. gordonii* CH1 and induces protection against oxidative stress and enhanced bacterial growth by expression of msrA. *Infect Immun* 2000;68:1061-8.
16. Caldelari I, Loeliger B, Langen H, Glauser MP, Moreillon P. Derepression of the arginine deiminase (arc) operon in penicillin-tolerant mutants of *S. gordonii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2802-10.
17. Isla A, Canut A, Rodríguez-Gascón A, Labora A, Ardaiza B, Salinis MA, et al. Análisis farmacocinético y farmacodinámico (PK/PD) de la antibioterapia en odontostomatología. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2005;23:116-21.
18. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Invest* 2003;7:181-8.